

Przeciwciała przeciwko białku p53 u chorych z rakiem jelita grubego

Dariusz Bielicki¹, Violetta Sulżyc-Bielicka², Józef Kładny², Wenancjusz Domagała³

Wprowadzenie. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące występowania przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicy krwi chorych z rakiem jelita grubego.

Celem pracy było zbadanie występowania przeciwciał anty p53 i podwyższonego stężenia antygenu rakowo-łagodowego w surowicy krwi chorych z tym nowotworem, a także określenie akumulacji białka p53 w tkance guza oraz określenie ich związku z takimi czynnikami, jak: wielkość, typ i umiejscowienie guza, stopień zróżnicowania histologicznego, obecność przerzutów do węzłów chłonnych, stopień zaawansowania klinicznego raka wg Astlera-Collera, wiek i płeć.

Metoda. Do badań włączono 229 chorych z ustalonym rozpoznaniem raka jelita grubego. U wszystkich chorych pobrano krew do badań serologicznych (występowanie przeciwciał anty p53 i stężenie antygenu CEA), zaś od 221 chorych pobrano wycinki tkankowe z guza do badań immunohistochemicznych.

Wyniki. Przeciwciała anty p53 stwierdzono u 62 chorych (27%). Przeciwciała te występowały częściej u chorych: w stadium D wg Astlera-Collera w porównaniu z chorymi w stadium B2 ($p=0,02$), z guzem zlokalizowanym w wstępnicy w porównaniu ze wstępnicą ($p=0,04$) oraz z guzem o średnicy większej niż 25 mm lub 30 mm. Akumulację białka p53 stwierdzano częściej u chorych w stadium B1 wg Astlera-Collera w porównaniu z chorymi w stadium C2 ($p=0,02$), jak również w guzach zlokalizowanych w esicy w porównaniu ze wstępnicą ($p=0,01$), w odbytnicy w porównaniu z wstępnicą ($p=0,01$) i w guzach lewej połowy jelita grubego w porównaniu z prawą połową ($p=0,003$).

Wnioski. 1. Występowanie przeciwciał anty p53 w surowicy krwi chorych z rakiem jelita grubego zależało od wielkości i lokalizacji guza oraz stopnia jego zaawansowania. 2. Obecność przeciwciał anty p53 tylko u około 1/4 chorych z rakiem jelita grubego jest istotnym ograniczeniem w wykorzystaniu tych przeciwciał w monitorowaniu pacjentów po zabiegu operacyjnym z powodu tego nowotworu.

Anti-p53 antibodies in colorectal cancer patients

Introduction. The aim of the study was to determine the association between anti-p53 antibodies, serum CEA levels and the immunohistochemically assessed accumulation of the p53 protein in the nuclei of tumor cells in selected patients with colorectal cancer and histological tumor stage according to Astler-Coller, tumor localization and size, the degree of histological differentiation and histological type, metastatic disease involving the peri-intestinal lymph nodes and patient gender and age.

Material and methods. The study included 229 patients with colorectal cancer diagnosed on the basis of histopathological or cytological examinations. In all the patients, serologic examinations were performed (serum anti-p53 antibodies presence and serum CEA level), in 221 patients, tumor tissue was available for histopathological examination.

Results. Serum anti-p53 antibodies were found in 62 patients (27%) with stage D disease according to Astler-Coller, p53 protein antibodies were more frequent in this group than in stage B2 patients ($p=0.02$). Serum anti-p53 antibodies were also more frequent in patients with tumors located in the descending colon, as compared to the ascending colon ($p=0.04$). In patients with tumors with a diameter of more than 25 mm or 30 mm, serum anti-p53 antibodies were more frequent than in patients with tumor less than or equal to 25 mm or 30 mm in diameter. The percentage of tumors with p53 protein accumulation was higher in stage B1 than in stage C2 ($p=0.02$), similarly as in the sigmoid vs. the ascending colon ($p=0.01$), in the rectum vs. the ascending colon ($p=0.01$) and in the left colon vs. the right colon ($p=0.003$).

Conclusions. 1. The presence of anti-p53 antibodies in the serum of patients with colorectal cancer depends on the size, location and tumor stage according to Astler-Coller. 2. The presence of serum anti-p53 antibodies in 25% of colorectal cancer patients only limits the use of the antibodies in clinical practice, for example as a prognostic factor, or in postoperative monitoring.

¹ Katedra i Klinika Gastroenterologii

² Klinika Chirurgii Onkologicznej

³ Katedra Patomorfologii Nowotworów
Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

Key words: colorectal cancer, carcinoembryonic antigen, anti p53 antibodies, p53 protein accumulation

Słowa kluczowe: jelito grube, rak, antygen rakowo-łródowy, przeciwiłcia, białko p53, akumulacja białka p53

Wstępn

Gen *p53* jest genem supresorowym, mieszczącym się na krótkim ramieniu chromosomu 17 w pozycji 13.1 [1]. Mutacje genu *p53* i utrata allelu w pozycji 17 p, czego następstwem sã zaburzenia funkcji, wydłuzenie okresu półtrwania i nadmierne gromadzenie się w jãdrach komórek nowotworowych kodowanego przez ten gen białka, sã zjawiskiem powszechnym w komórkach ludzkich nowotworów złośliwych [1]. W 1982 r. Crawford i wsp. stwierdzili obecność przeciwiłciãł przeciwno białku p53 w surowicy chorych z rakiem piersi [2]. Zaistniała więc moźliwość analizy zmian genu *p53* za pomocã prostych i relatywnie tanich testów serologicznych. Z drugiej strony duzym ograniczeniem metod serologicznych jest fakt, że nie u wszystkich chorych z akumulacjà białka p53 w tkance guza pojawiają się przeciwiłcia anty-p53.

Mutacje genu *p53* wykryto u 40 do 70% chorych na raka jelita grubego, przy czym nie jest do końca określone znaczenie tego zjawiska dla praktyki klinicznej [3]. Niektórzy badacze wskazują na wpływ mutacji bãdź akumulacji białka p53 na złe rokowanie [4], inni zwiãzku takiego nie stwierdzają [5]. Do chwili obecnej ukazało się niewiele publikacji oceniających występowanie przeciwiłciãł anty-p53 w surowicy chorych z rakiem jelita grubego. Istnieją rozbieżne poglądy dotyczãce korelacji pomiãdzy wiekiem, płciã, umiejscowieniem guza, jego wielkością, obecnoścã przerzutów do węzłów chłonnnych i wãtroby, stadium zaawansowania według Dukesa lub Astlera-Collera, a obecnoścã przeciwiłciãł anty-p53 [6-9].

Celem pracy było określenie zwiãzku pomiãdzy występowaniem przeciwiłciãł anty-p53, stęzeniem CEA w surowicy u chorych na raka jelita grubego oraz akumulacjà białka p53 w jãdrach komórek rakowych (oceniając immunohistochemicznie) u tych samych chorych, a: stopniem zaawansowania histologicznego raka według Astlera-Collera, lokalizacjà i rozmiarami guza, stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym raka, obecnoścã przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnnych, płciã i wiekiem chorych.

Materiał i metody

Badaniami objęto 229 chorych z rozpoznaniem histopatologicznie lub cytologicznie rakiem jelita grubego. Rozpoznanie ustalono na podstawie wyników badañ endoskopowo pobranych wycinków (221 przypadków) lub wymazów szczoteczkowych (8 przypadków). Wiek chorych wynosił od 30 do 85 lat (średnia 63,26; SD ± 10,47). Wśród nich było 109 kobiet (48%) i 120 męczyzn (52%). Jako grupę kontrolną włączono do badañ 52 osoby w wieku od 16 do 86 lat (średnia 54,81; SD ± 17,60), u których wykluczono nowotwór złośliwy.

U wszystkich chorych wykonano badania serologiczne (ocena obecności przeciwiłciãł przeciwno białku p53 oraz oznaczenie stęzenia CEA w surowicy), u 221 badanie histopatologiczne, a u 8 tylko badanie cytologiczne wymazów szczoteczkowych z guza.

Na przeprowadzenie badañ uzyskano zgodę Komisji Etyki Pomorskiej Akademii Medycznej.

Badania serologiczne

Krew do analizy od 229 chorych była pobierana po badaniu endoskopowym lub przed zabiegiem operacyjnym, a następnie zamrażana do -20° C. W badaniach serologicznych wykorzystano metodę ELISA [2]. Do analiz użyto ludzkiego rekombinowanego białka p53 (Dianova, Niemcy), które wiãzało przeciwiłcia anty-p53 badanej surowicy. Jako znacznik zastosowano kompleks peroksydazy i przeciwiłciãł kozich przeciwno ludzkiej immunoglobulinie IgG. Aktywność enzymatycznã roztworu oznaczano po dodaniu chromogennego substratu TMB. Do odczytu użyto analizatora immunologicznego EL 301 (Behring, Niemcy). Przy interpretacji wyników obliczono tzw. wskaźnik autoimmunizacji p53 według następnego wzoru:

$$\text{wskaźnik autoimmunizacji p53} = \frac{\text{abp} - \text{apkn}}{\text{apkw} - \text{apkn}} \times 100\%$$

abp – absorpcja badanej próbki

apkn – absorpcja próbki kontrolnej o niskim stęzeniu

apkw – absorpcja próbki kontrolnej o wysokim stęzeniu

Wartości wskaźnika autoimmunizacji ≤10% były traktowane jako brak obecności przeciwiłciãł anty-p53 w surowicy, zaś wartoścì >10% jako wskazujące na obecnoścì tychże przeciwiłciãł w surowicy.

Dodatkowo u tych samych chorych oznaczano stęzenie CEA w surowicy przy użyciu rutynowych testów diagnostycznych (MEIA). Wartoścì >5 µg/l (5 ng/ml) były traktowane jako podwyższone.

Badania histologiczne i cytologiczne

Wycinki endoskopowe oraz materiał pooperacyjny utrwalono w zbuforowanej formalinie o stęzeniu 3,43 mol/l (10%). Skrawki parafinowe barwiono rutynowo hematoksylinã i eozyną. Wymazy szczoteczkowe utrwalono w alkoholu etylowym o stęzeniu 16,95 mol/l (96%), a następnie barwiono hematoksylinã i eozyną.

Badania immunohistochemiczne

Akumulacjà białka p53 oznaczono w jãdrach komórek rakowych u 206 osób. Do badañ immunohistochemicznych zastosowano przeciwiłcia monoklonalne przeciwno białku p53 (DO1, Novocastra, Wlk. Brytania), które reagują zarówno ze zmutowanym, jak i „dzikim” białkiem p53. Przeprowadzono odpowiednie reakcje kontrolne dodatnie i ujemne. Reakcje immunohistochemiczne uwidocznilo metodã peroksydazowã kompleksu streptawidyna-biotyna (używając gotowych odczynników z firmowego zestawu Streptavidin-biotin-peroxidase kit-Histostain-SP-kit firmy Zymed Lab, USA). Jãdra komórkowe podbarwiono hematoksylinã Meyera, a skrawki przykrywano w Glycergełu (Dako). Ocena wyników reakcji została dokonana za pomocã komputerowej analizy obrazu (Qantimet 600 S firmy Leica). Za wartoścì granicznã odczynu dodatniego przyjęto ≥10% komórek rakowych z jãdrami wykazującymi dodatni odczyn immunohistochemiczny.

Analizę statystycznã przeprowadzono przy użyciu testu χ2 oraz χ2 z poprawkã Yatesa.

Wyniki

Podstawowe dane kliniczno–patologiczne podane są w Tabeli I. U 220 chorych rozpoznano gruczolakoraka (*adenocarcinoma*), a u 9 raka śluzowego (*carcinoma mucinosum*). Stopień zróżnicowania histologicznego ustalono w 212 przypadkach: w 102 (48%) były to raki w stopniu pierwszym, w 81 (38%) w stopniu drugim i w 29 (14%) w stopniu trzecim. U 9 chorych z rakiem śluzowym i u 8 leczonych objawowo, u których rozpoznanie ustalono tylko na podstawie cytologicznego badania wymazu szczoteczkowego, nie określono stopnia zróżnicowania histologicznego.

Tab. I. Podstawowe dane kliniczno-patologiczne 229 raków jelita grubego

Parameter	N
Umiejscowienie guza:	
odbytnica	76
esica	77
zstępnicza	14
zagięcie śledzionowe	6
poprzecznicza	16
zagięcie wątrobowe	7
wstępnicza	14
kątnica	15
brak danych	4
Astler-Coller:	
A	6
B1	32
B2	74
C1	15
C2	38
D	53
brak danych	11
LN:	
(+)	70
(-)	130
brak danych	29
Histopatologia:	
<i>adenocarcinoma</i>	
I	102
II	81
III	29
<i>mucinous carcinoma</i>	
	9

Obecność przeciwciał przeciwko białku p53

U żadnej osoby z grupy kontrolnej nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-p53 w surowicy. W grupie badanej przeciwciała przeciwko białku p53 stwierdzono u 62 chorych (27%) (Tab. I). U chorych z rakiem w stopniu D według Astlera-Collera przeciwciała przeciwko białku p53 występowały częściej niż u badanych z rakiem w stopniu B2 (Tab. II). Również częściej przeciwciała te stwierdzano u chorych z guzem umiejscowionym w zstępniczy, w porównaniu z pacjentami z guzem zlokalizowanym we wstępniczy (Tab. III). U chorych z guzem o średnicy

Tab. II. Płeć, wiek, występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 i CEA w surowicy w grupie 229 badanych oraz akumulacja białka p53 w tkance guza w grupie 206 badanych

Dane:	N (%)
Płeć:	
K	109 (48)
M	120 (52)
Wiek:	
≤ 50 l.	27 (12)
51-60 l.	48 (21)
61-70 l.	93 (41)
> 70 l.	61 (26)
Ab p53:	
(-)	167 (73)
(+)	62 (27)
CEA:	
(-)	155 (68)
(+)	74 (32)
p53: n=206	
(-)	105 (51)
(+)	101 (49)

większej niż 30 mm przeciwciała przeciwko białku p53 występowały częściej niż u chorych z guzem o średnicy mniejszej bądź równej 30 mm (Tab. IV). Podobna zależność dotyczyła guzów o średnicy większej niż 25 mm, w porównaniu z guzami o średnicy mniejszej lub równej 25 mm (Tab. IV). Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 nie miało związku z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, płcią, wiekiem, stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym raka.

Akumulacja białka p53 w tkance guza

Białko p53 w tkance guza oznaczono u 206 chorych: u 149 w preparatach operacyjnych, a w pozostałych przypadkach, ze względu na ich brak w wycinkach endoskopowych u 53 pacjentów i w wymazach cytologicznych u 4 chorych. Akumulację białka p53 stwierdzono u 101 chorych (49%) (Tab. I). Stwierdzono statystycznie istotne zależności pomiędzy akumulacją białka p53 w tkance guza, a stopniem zaawansowania i umiejscowieniem guza. Akumulacja występowała częściej w guzach stopnia B1 niż stopnia C2 (Tab. II), umiejscowionych w esicy niż we wstępniczy (Tab. III), w odbytnicy niż we wstępniczy (Tab. III) oraz w lewej niż w prawej połowie jelita grubego (Tab. III). Nie miała związku z wymiarami guza, występowaniem przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych, płcią, wiekiem, stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym raka.

Stężenie CEA w surowicy

Stężenie CEA oznaczono u wszystkich 229 badanych oraz w grupie kontrolnej. Tylko u jednej osoby z grupy kontrolnej z rozpoznaniem zespołu jelita drażliwego stwierdzono podwyższone do 25 µg/l (25 ng/ml) stężenie CEA

Tab. III. Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 i CEA w surowicy oraz akumulacji białka p53 w tkance guza w zależności od stopnia zaawansowania raka według Astlera-Collera*

Grupy wg Astlera-Collera	Ab p53 (n=218)		p53 (n=196)		CEA (n=218)	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
A	6 (100%)	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)	6 (100%)	0 (0%)
B1	24 (75%)	8 (25%)	10 (34%)	19 (66%)	29 (91%)	3 (9%)
B2	58 (78%)	16 (22%)	35 (51%)	33 (49%)	57 (77%)	17 (23%)
C1	12 (80%)	3 (20%)	6 (43%)	8 (57%)	13 (87%)	2 (13%)
C2	27 (71%)	11 (29%)	22 (65%)	12 (35%)	19 (50%)	19 (50%)
D	31 (58%)	22 (42%)	23 (50%)	23 (50%)	25 (47%)	28 (53%)

* brak danych dotyczących klasyfikacji Astlera-Collera u 11 osób

Różnice statystycznie istotne dotyczyły:

- obecności przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicy krwi
B2 vs D ($p=0,02$, $\chi^2=5,83$)
- akumulacji białka p 53 w tkance guza
B1 vs C2 ($p=0,02$, $\chi^2=5,72$)
- podwyższonego stężenia CEA w surowicy krwi
A vs D ($p=0,02$, $\chi^2=5,72$, z poprawką Yatesa)
B1 vs C2 ($p=0,0003$, $\chi^2=13,3$)
B1 vs D ($p=0,0001$, $\chi^2=16,26$)
B2 vs C2 ($p=0,004$, $\chi^2=8,41$)
B2 vs D ($p=0,0005$, $\chi^2=12,03$)
C1 vs C2 ($p=0,015$, $\chi^2=5,93$)
C1 vs D ($p=0,007$, $\chi^2=7,29$)

w surowicy. Podwyższone wartości CEA stwierdzono u 74 chorych (32%) (Tab. I). Stwierdzono statystycznie istotne zależności pomiędzy podwyższonym stężeniem CEA w surowicy ($>5 \mu\text{g/l}$), a stopniem zaawansowania klinicznego raka (Tab. II). Podwyższone stężenie CEA występowało częściej w w przypadkach raków w stopniu D niż w A ($p=0,02$), B1 ($p=0,0001$), B2 ($p=0,005$) i C1 ($p=0,007$) oraz częściej w rakach w stopniu C2 niż w B1 ($p=0,0003$), B2 ($p=0,004$) i C1 ($p=0,015$). Statystycznie istotne zależności wystąpiły pomiędzy podwyższonym stężeniem CEA, a guzami o średnicy $\leq 35 \text{ mm}$ i $> 35 \text{ mm}$ ($p=0,03$), guzami o średnicy $\leq 30 \text{ mm}$ i $> 30 \text{ mm}$ ($p=0,01$) oraz guzami o średnicy $\leq 25 \text{ mm}$ i $> 25 \text{ mm}$ ($p=0,01$) (Tab. V), a także pomiędzy podwyższoną zawartością CEA w surowicy i obecnością przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych (Tab. V). Podwyższone wartości CEA nie miały związku z lokalizacją raka, płcią, wiekiem, stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym raka.

Omówienie

Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicy krwi chorych z rakiem jelita grubego

W badaniach własnych wykazano występowanie przeciwciał anty-p53 w surowicy u 27% chorych z rakiem jelita

grubego. Obecność tą stwierdzono we wszystkich stadiach zaawansowania raka według Astlera-Collera, z wyjątkiem stadium A, na co mogła mieć wpływ niewielka liczebność tej podgrupy (tylko 6 chorych). Uzyskane wyniki są zbliżone do podawanych w piśmiennictwie, gdzie częstość występowania przeciwciał anty-p53 w surowicy (ocenianych za pomocą metody ELISA) wynosiła od 13 do 32% [6-8, 10-11]. Przeciwciała anty-p53 mogą być także obecne w bardzo wczesnym stadium zaawansowania raka. Angelopoulou i wsp. wykryli je u 6 z 23 chorych w stadium A według Astlera-Collera [6].

Zależności pomiędzy występowaniem przeciwciał przeciwko białku p53, a analizowanymi czynnikami

W analizowanej grupie chorych stwierdzono zależność pomiędzy częstszym występowaniem przeciwciał anty-p53, a stopniem zaawansowania, lokalizacją oraz wymiarami guza. Przeciwciała anty-p53 występowały częściej: w stadium D w porównaniu ze stadium B2, w zstępnicy niż we wstępnicy oraz w guzach większych niż 25 mm i 30 mm.

Częstsze występowanie przeciwciał anty-p53 w zaawansowanych stadiach raka jelita grubego jest w piśmiennictwie problemem kontrowersyjnym. Zwrócono uwagę, że przeciwciała anty-p53 występowały częściej u chorych z rakiem jelita grubego w stopniu D niż w stop-

Tab. IV. Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 i CEA w surowicy oraz akumulacji białka p53 w tkance guza w zależności od umiejscowienia guza*

Umiejscowienie	Ab p53 (n=225)		p53 (n=203)		CEA (n=225)	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Odbytnica	53 (70%)	23 (30%)	31 (45%)	38 (55%)	53 (70%)	23 (30%)
Esica	58 (75%)	19 (25%)	31 (44%)	40 (56%)	56 (73%)	21 (27%)
Zstępnica	7 (50%)	7 (50%)	6 (50%)	6 (50%)	8 (57%)	6 (43%)
Zgięcie śledzionowe	6 (100%)	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)	4 (67%)	2 (33%)
Poprzecznicza	12 (75%)	4 (25%)	10 (71%)	4 (29%)	9 (56%)	7 (44%)
Zgięcie wątrobowe	5 (71%)	2 (29%)	4 (67%)	2 (33%)	3 (43%)	4 (57%)
Wstępnicza	13 (93%)	1 (7%)	11 (85%)	2 (15%)	11 (79%)	3 (21%)
Kątnica	10 (67%)	5 (33%)	7 (54%)	6 (46%)	10 (67%)	5 (33%)
Lewa połowa jelita	124 (72%)	49 (28%)	70 (49%)	87 (55%)	121 (70%)	52 (30%)
Prawa połowa jelita	40 (77%)	12 (23%)	32 (70%)	14 (30%)	33 (63%)	19 (37%)

* brak danych dotyczących umiejscowienia guza u 4 osób

Różnice statystycznie istotne dotyczyły:

– obecności przeciwciał przeciwko białku p53 – wstępnicza vs zstępnica (test Fishera, $p=0,04$)

– akumulacji białka p53 w tkance guza:

wstępnicza vs esica ($p=0,007$, $\chi^2=7,28$);

wstępnicza vs odbytnica ($p=0,001$, $\chi^2=6,81$);

prawa vs lewa połowa jelita grubego ($p=0,003$, $\chi^2=8,88$)

niu C lub stopniu A-C według Duke'a [9]. Zależności tych nie potwierdzili inni badacze [6-8, 11]. Stwierzonego przez autora związku pomiędzy lokalizacją guza, a występowaniem przeciwciał anty-p53 nie potwierdzają inni autorzy, jakkolwiek Coomber podaje, że przeciwciała anty-p53 były obecne częściej u chorych z guzami o proksymalnej lokalizacji, nie były to jednak różnice istotne statystycznie [7, 10]. Tylko Houbiers i wsp. analizowali związek pomiędzy wymiarami guza, a występowaniem przeciwciał anty-p53, nie znajdując zależności pomiędzy tymi czynnikami [11]. Wydaje się, że stwierdzone w badaniach własnych zależności w tym zakresie można wytłumaczyć większym prawdopodobieństwem wystąpienia martwicy w większych guzach (gorsze ukrwienie części środkowej guza), a co za tym idzie, większą możliwością immunizacji i produkcji przeciwciał przeciwko białku p53.

W badanej grupie chorych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy częstszym występowaniem przeciwciał anty-p53, a: stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym raka, przerzutami do okołojelitowych węzłów chłonnych, płcią i wiekiem chorych. Coomber i wsp. oraz Houbiers i wsp. również nie wykryli związku pomiędzy występowaniem przeciwciał anty-p53, a przerzutami do okołojelitowych

węzłów chłonnych [10, 11]. Istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące istnienia zależności [10] lub jej braku [6, 8-9] pomiędzy występowaniem przeciwciał anty-p53, a stopniem histologicznego zróżnicowania raka. Houbiers i wsp. wykazali korelację pomiędzy występowaniem tych przeciwciał, a stopniem histologicznego zróżnicowania raka, zajęciem okolicznych naczyń krwionośnych oraz kształtem guza [11]. Hammel i wsp. stwierdzili wprawdzie w grupie 54 chorych z rakiem jelita grubego, że pacjenci z obecnością przeciwciał anty-p53 byli młodszy niż badani bez tych przeciwciał, zależność ta nie została jednak potwierdzona [7]. Nie znaleziono również korelacji pomiędzy płcią, a występowaniem przeciwciał anty-p53 [6, 8-11].

Akumulacja białka p53 w tkance guza u chorych z rakiem jelita grubego

Akumulację białka p53 w tkance guza stwierdzono u 101 (49%) chorych z rakiem jelita grubego. Wartość ta jest zbliżona do danych z piśmiennictwa; aktualnie uważa się, że u około połowy chorych z tym nowotworem występuje akumulacja białka p53. Duże rozbieżności w wartościach podawanych przez różnych autorów (38 vs 76%) [12-13] wynikają prawdopodobnie z odmiennego rodzaju mate-

Tab. V. Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 i CEA w surowicy oraz akumulacji białka p53 w tkance guza w zależności od wymiarów guza*

Średnica guza w mm	Ab p53 (n=193)		p53 (n=176)		CEA (n=193)	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
≤ 60	120 (74%)	43 (26%)	70 (48%)	76 (52%)	118 (72%)	45 (28%)
> 60	25 (83%)	5 (17%)	18 (60%)	12 (40%)	20 (67%)	10 (33%)
≤ 50	107 (75%)	36 (25%)	66 (51%)	64 (49%)	105 (73%)	38 (27%)
> 50	38 (76%)	12 (24%)	22 (48%)	24 (52%)	33 (66%)	17 (34%)
≤ 45	72 (75%)	24 (25%)	46 (51%)	44 (49%)	69 (72%)	27 (28%)
> 45	73 (75%)	24 (25%)	42 (49%)	44 (51%)	69 (71%)	28 (29%)
≤ 40	66 (79%)	18 (21%)	41 (52%)	38 (48%)	64 (76%)	20 (24%)
> 40	79 (72%)	30 (28%)	47 (48%)	50 (52%)	74 (68%)	35 (32%)
≤ 35	44 (81%)	10 (19%)	24 (49%)	25 (51%)	46 (85%)	8 (15%)
> 35	101 (73%)	38 (27%)	64 (51%)	63 (49%)	92 (66%)	47 (34%)
≤ 30	35 (87,5%)	5 (12,5%)	18 (49%)	19 (51%)	34 (85%)	6 (15%)
> 30	110 (72%)	43 (28%)	70 (50%)	69 (50%)	104 (68%)	49 (32%)
≤ 25	23 (100%)	0 (0%)	11 (55%)	9 (45%)	22 (96%)	1 (4%)
> 25	122 (72%)	48 (28%)	77 (49%)	79 (51%)	116 (68%)	54 (32%)

* brak danych dotyczących wielkości guza u 36 osób

Różnice statystycznie istotne dotyczyły:

- podwyższone stężenie CEA w surowicy: guzy o średnicy ≤35 mm vs >35 mm ($p=0,03$, $\chi^2=6,89$); guzy o średnicy ≤30 mm vs >30 mm ($p=0,009$, $\chi^2=4,51$); guzy o średnicy ≤25 mm vs >25 mm ($p=0,01$, χ^2 z poprawką Yatesa = 6,19);
- obecność przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicy krwi: guzy o średnicy ≤30 mm vs >30 mm ($p=0,04$, χ^2 z poprawką Yatesa = 4,11); guzy o średnicy ≤25 mm vs >25 mm ($p=0,003$, χ^2 z poprawką Yatesa = 8,6)

riału wykorzystanego do badań (błoczki parafinowe lub materiał mrożony) oraz rodzaju przeciwciał przeciwko białku p53, użytych do reakcji immunohistochemicznej (np. poliklonalne CM-1 oraz monoklonalne DO-1, DO-7, PAb 240, PAb1801, PAb421). W różny sposób oceniano także wynik reakcji immunohistochemicznej. Za wartości graniczne pozytywnych odczynów przyjmowano 10% [7]

lub 30% [14] komórek nowotworowych, w których jądrach występowała akumulacja białka p53.

W materiale własnym akumulacja białka p53 nie miała związku ze stopniem histologicznego zróżnicowania i typem histologicznym guza, wymiarami guza, występowaniem przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych, płcią i wiekiem chorych. Podobne wyniki przedstawili inni autorzy, jedynie Tollenaar i wsp. [14]

Tab. VI. Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 i CEA w surowicy oraz akumulacji białka p53 w tkance guza w zależności od obecności przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych*

LN	Ab p53 (n=200)		p53 (n=181)		CEA (n=200)		p
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
LN (-)	100 (77%)	30 (23%)	59 (51%)	57 (49%)	101 (78%)	29 (22%)	$p=0,002$
LN (+)	50 (71%)	20 (29%)	34 (52%)	31 (48%)	40 (57%)	30 (43%)	$\chi^2=9,24$

* brak danych dotyczących obecności przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych u 29 osób

stwierdzili częstsze występowanie akumulacji białka p53 w gruczolakorakach, w porównaniu z rakami śluzowymi. Stwierdzono przez autora częstsze występowanie akumulacji białka p53 w guzach zlokalizowanych w dystalnej części jelita grubego zostało również opisane przez Manne i wsp. w grupie liczącej 300 chorych [15]. Uważa się, że akumulacja białka p53 nie ma związku z bardziej zaawansowanym stadium choroby, co stwierdzono również w materiale własnym. Występowała ona nawet częściej u chorych w stadium B1, w porównaniu z chorymi w stadium C2. Dokładna przyczyna tego zjawiska nie jest znana.

CEA w surowicy chorych z rakiem jelita grubego

Podwyższone stężenie CEA przed operacją występuje w 10-85% przypadków raka jelita grubego [16-17] i zależy od stopnia klinicznego zaawansowania choroby. W badaniach własnych podwyższoną zawartość CEA w surowicy stwierdzono u 74 spośród 229 (32%) chorych z rakiem jelita grubego oraz u 28 spośród 53 (53%) pacjentów z guzami w stopniu D według Astlera-Collera. Podwyższone stężenie CEA występowało częściej u chorych w bardziej zaawansowanym stadium choroby, z obecnością przerzutów do okołojelitowych węzłów chłonnych i większą średnicą guza, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa [18-20], podobnie jak i brak związku z lokalizacją i typem histologicznym guza oraz płcią i wiekiem chorych. Jedynie Forones i wsp. nie stwierdzili zależności pomiędzy stężeniem CEA, a stadium zaawansowania choroby, co być może spowodowane było zbyt małą liczbą badanych chorych – 74 osoby [21]. Podawany przez Chapmana i wsp. związek pomiędzy stopniem zróżnicowania histologicznego, a stężeniem CEA w surowicy w grupie 227 chorych z rakiem jelita grubego nie został potwierdzony w badaniach własnych, ani w badaniach innych autorów [20].

Wnioski

1. Obecność przeciwciał anty-p53 w surowicy krwi chorych z rakiem jelita grubego zależy od rozmiarów, umiejscowienia i stopnia zaawansowania nowotworu według Astlera-Collera.
2. Występowanie przeciwciał przeciwko białku p53 w surowicy u zaledwie 25% chorych z rakiem jelita grubego ogranicza wykorzystanie tych przeciwciał w praktyce klinicznej, np. jako czynnika prognostycznego lub w monitorowaniu pacjentów po zabiegu operacyjnym.

Dr hab. n. med. Dariusz Bielicki
Katedra i Klinika Gastroenterologii
i Chorób Wewnętrznych PAM
ul. Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin
e-mail: kgastro@sci.pam.szczecin.pl

Objaśnienia skrótów do tabel

Ab p53	– przeciwciała przeciwko białku p 53 w surowicy; (+) obecne, (-) nieobecne
p53	– akumulacja białka p53 w tkance guza; (+) obecna, (-) nieobecna
CEA	– antygen karcinoembrionalny w surowicy; (+) stężenie podwyższone podwyższone >5 µg/l, (-) stężenie prawidłowe
LN	– przerzuty do okołojelitowych węzłów chłonnych; (+) obecne, (-) nieobecne
stopień G	– stopień histologicznego zróżnicowania
P.P.	– prawa połowa jelita grubego, tzn. kątnica, okrężnica wstępująca (wstępnicza), zgięcie prawe (wątrobowe) okrężnicy, okrężnica poprzeczna (poprzecznicza)
L.P.	– lewa połowa jelita grubego, tzn. zgięcie lewe (śledzionowe) okrężnicy, okrężnica zstępująca (zstępnica), okrężnica esowata (esica) i odbytnica
M	– mężczyźni
K	– kobiety

Piśmiennictwo

1. Oren M. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 1985; 823: 67-78.
2. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982; 30: 403-8.
3. Holstein M, Sidransky D, Vogelstein B i wsp. p53 mutations in human cancer. *Science* 1991; 253: 49-53.
4. Goh HS, Yao J, Smith DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55: 5217-21.
5. Dix BR, Robbins P, Soong R i wsp. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59: 747-51.
6. Angelopoulou K, Stratis M, Diamandis EP. Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 70: 46-51.
7. Hammel P, Bossier B, Chaumette MT i wsp. Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 1997; 40: 356-61.
8. Kressner U, Gimelius B, Berstroem R i wsp. Increased serum p53 antibody levels indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1848-51.
9. Shiota G, Ishida M, Noguchi N i wsp. Circulating p53 antibody in patients with colorectal cancer. Relation to clinicopathologic features and survival. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 122-28.
10. Coomber D, Hawkins NJ, Clark M i wsp. Characterisation and clinicopathological correlates of serum anti-p53 antibodies in breast and colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 757-62.
11. Houbiers JGA, van der Burg SH, van de Watering LMG i wsp. Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 637-41.
12. Sakuma K, Fujimori T, Hirabayashi K i wsp. Cyclooxygenase COX-2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1999; 34: 189-94.
13. Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996; 74: 216-23.
14. Tollenaar RAEM, van kreiken JH, van Slooten i wsp. Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 1998; 77: 1842-7.
15. Manne U, Weiss HL, Myers RB i wsp. Nuclear accumulation of p53 in colorectal adenocarcinoma. Prognostic importance differs with race and location of the tumor. *Cancer* 1998; 83: 2456-67.
16. Tobaruela E, Enriquez J, Diez M i wsp. Evaluation of serum carcinoembryonic antigen monitoring in the follow-up of colorectal cancer patients with metastatic lymph nodes and a normal preoperative serum level. *Int J Biol Markers* 1997; 12: 18-21.
17. Wolf R, Cohen A. The miniscule benefit of serial carcinoembryonic antigen monitoring after effective curative treatment for primary colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 1997; 185: 60-4.

18. Andicoechea A, Vizoso F, Alexandre E i wsp. Preoperative carbohydrate antigen 195 (CA 195) and CEA serum levels as prognostic factors in patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 1998; 13: 158-64.
19. Carriquiry L, Pineyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 921-9.
20. Chapman MAS, Buckley D, Henson DB i wsp. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumor stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1346-49.
21. Forones N, Tanaka M. CEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 905-8.

Otrzymano: 26 października 2006 r.

Przyjęto do druku: 3 stycznia 2007 r.